

運動ニューロンの傷害／修復に関わるグリコーゲン代謝の研究

Study of glycogen metabolism related to the injury/repair of motoneurons

12D5603 竹澤洋亮

指導教員 中嶋一行

SYNOPSIS

I biochemically determined glycogen content in the axotomized facial nucleus of adult rats up to 35 days post-insult. The amounts of glycogen in the transected facial nucleus were significantly increased at 5 days post-insult, peaked at 7 days post-insult, and declined to the control levels at 21-35 days post-insult. Immunohistochemical analysis using anti-glycogen antibody revealed that the quantity of glycogen granules in the axotomized facial nucleus was greater than that in the control nucleus at 7 days post-injury. Dual staining methods clarified that the glycogen was localized with motoneurons. I also examined the amounts of total glycogen synthase (GS) and inactive GS (phosphorylated GS) in both transected and control nuclei for 35 days by immunoblotting. The ratio of inactive GS to total GS was significantly decreased in the injured nucleus from 1 to 3 days post-insult, and significantly increased from 7 to 14 days post-insult, suggesting that glycogen is actively synthesized in the early period post-injury, but suppressed after 7 days post-insult. Collectively, my results clarified the transient up-regulation of glycogen contents in transected facial motoneurons. The enhanced glycogen at around 5 to 7 days post-insult was suggested to be responsible for the decrease in inactive GS levels, and the decrease after 14 days post-insult was considered to be caused by increased inactive GS levels and possibly the increase in active glycogen phosphorylase.

Keywords: facial nerve, transection, motoneuron, glycogen, glycogen synthase, regeneration

1. 緒言

成熟ラットの顔面神経を傷害すると、同側の顔面神経核では、運動ニューロンおよびその周囲のグリア細胞は様々な変化を起こす。傷害運動ニューロンは、コリンアセチルトランスフェラーゼおよび小胞型アセチルコリントランスポートの発現量を著しく減少させる (1)。この時、ミクログリアは、形態を変化させると共に DNA の複製を起こし増殖期に入る (2)。アストロサイトは増殖しないが、中間系フィラメントである GFAP を長期間にわたり増加させ、活性化状態を維持している (3)。このような傷害神経核内の組織再構築とも言える大変動には、多量のエネルギーが使用されると推測されてきた。

神経系で消費されるエネルギーのほとんどは、血液中のグルコースに由来すると言われているので、実質内でエネルギーが不足する時は、この取り込みが増加すると考えられた。実際、ラットの

傷害顔面神経核 (4) および傷害舌下神経核 (5) では、グルコースの取り込みが増加することが報告されている。

また、神経系には、肝臓よりは低値ながらグリコーゲンが存在するが、これは、緊急時のグルコース供給に使用されると推測されてきた。この推測を支持するように、ラットの傷害された脊髄の運動ニューロンでは、活性型のグリコーゲンホスホリラーゼの顕著な増加が見られている (6)。グリコーゲン自体も、発達期の舌下神経核や顔面神経核の運動ニューロン (7) および傷害されたニワトリの脊髄運動ニューロン (8) に検出されている。これらの知見は、運動ニューロンが発達状態および傷害状態に合わせて、グリコーゲンを活発に分解／合成することを示唆している。しかし、運動ニューロン傷害後、グリコーゲン量がどのように変動するのか、また、その量の変動は、どんなメカニズムで調節されるかについては、全く不

明の状態である。そこで本研究では、ラット顔面神経系を用いて、運動ニューロンの傷害後のグリコーゲン量を定量解析し、その変動を細胞レベルで示すと共に、グリコーゲン合成／分解酵素から説明することを目的とした。

2. 実験方法

2-1 ラットの顔面神経傷害系

成熟ウイスターラット(8 週齢の雄)の右側顔面神経を茎乳突孔の位置で切断した。その後、1、3、5、7、14、21、28、35 日めに、エーテル麻酔下で断頭し、全脳を摘出し-80℃に保存した。

2-2 脳の各部位および顔面神経核の回収

凍結脳から大脳皮質、小脳皮質、脳幹部分を切り出し、湿重量 (mg) を測定した。また、肝臓からも小片を切り出し、湿重量 (mg) を測定した。

顔面神経核は、常法により、傷害側およびコントロール側から切り出し、それぞれ、R 側、L 側とし、湿重量 (mg) を計測した。

2-3 グリコーゲンの抽出および定量

組織からグリコーゲンを抽出する方法としては、アルカリ抽出法を採用した。組織片 (肝臓、脳、神経核など) に 30%水酸化カリウム溶液を 1 ml 加え、100℃中でタンパク質を分解した。その溶液に 97%エタノールを 1.75 ml 添加し、グリコーゲンを沈殿させた。このグリコーゲンはもう一度、97%エタノールで洗い、回収した。次に、グリコーゲンの入った試験管に 2 mol/L の硫酸を 1 ml 加え、100℃で 2 時間加熱することにより、グリコーゲンの分解を行った。反応終了後に 2 mol/L の水酸化ナトリウムを 1 ml を加え中和した。

グリコーゲン (グルコース) の定量はアントロン硫酸法に基づいて行った。上記グリコーゲン分解物を含む試験管に 0.2%アントロン硫酸溶液を 1.2 ml 添加した。その反応液を 100℃で 10 分間加熱し、流水中に 5 分間静置し冷却を行った。グリコーゲンの標準曲線は、既知量のグリコーゲンを使用することにより作成した。発色した各試料溶液は、620 nm における吸光度を測定した。測定さ

れたグリコーゲン量は、各組織の湿重量 (mg) 当たりに換算した。

2-4 免疫組織化学

肝臓および脳幹の組織切片は、クリオスタットにより、厚さ 10 μ m で作製した。この凍結切片は、常法により 4%パラホルムアルデヒド/PBS で、4℃、30 分間の固定を行った。PBS で洗浄後、50/100/50% アセトンで 2/3/2 分間処理を行った。ブロッッキングは、室温で、0.2%スキムミルクおよび 0.067% BSA を含む PBS 溶液で 1 時間行った。

一次抗体としては、抗グリコーゲン抗体 (1:400)、抗 GFAP 抗体 (1:1000)、抗 NR3B 抗体 (1:400) を使用した。また、二次抗体として Alexa Fluor 488 anti-mouse IgM 抗体 (1:100)、Alexa Fluor 568 anti-mouse IgG 抗体 (1:200) および Alexa Fluor 568 anti-rabbit IgG 抗体 (1:200) を用いた。

2-5 イムノブロット

切り出した顔面神経核は、常法により超音波破碎を行い、組織抽出液を調製し、イムノブロットの試料とした。14%アクリルアミドゲルを用いて SDS-電気泳動を行い、タンパク質をイモビロン上に転写した。2%スキムミルクを含む溶液でブロッッキング処理を行った。一次抗体として、抗 GS 抗体 (1:4000)、抗 pGS 抗体 (1:1000) および抗 GP 抗体 (1:400) を使用した。二次抗体の反応後、これら抗原-抗体複合体は ECL を用いて検出した。

2-6 統計解析

グリコーゲンの測定値およびデンストメータで測定したタンパク質のバンドの濃さは、平均値 \pm 標準偏差で表した。傷害核の値がコントロール側と有意な差があるかどうかは、two-tailed unpaired Student's t-test を用いて検定した。 $P < 0.05$ で有意差があると判定した(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

3. 結果および考察

3-1 傷害顔面神経核のグリコーゲン

アントロン硫酸法により、標準グリコーゲンを定量したところ、グリコーゲン量 (0~10 μ g) と

吸光度（620 nm）の間にはよい比例関係が認められた。約 2.0 μg のグリコーゲンが検出可能であった。

次に、少量（数 mg）の肝臓および脳組織のグリコーゲンを定量した。その結果、肝臓は $121.9 \pm 8.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、大脳皮質、小脳皮質、脳幹では、それぞれ $1.9 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、 $3.0 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ 、 $2.9 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{mg}$ という値を示した。この測定結果は、過去に報告された値と同等であった。従って、比較的少量の脳組織を用いても、グリコーゲンを測定できることが分かった。

次に、経時的に回収した傷害神経核およびコントロール核のグリコーゲンを定量した。図 1 に示すように、傷害側のグリコーゲン量は 1 日後から増加傾向が見られたが、5 日目から有意な増加となり、7 日後には最大となった（コントロール側に対して約 1.7 倍）。しかし、14 日以降は、減少しはじめ、21 日にはほとんど差が見られなくなった。

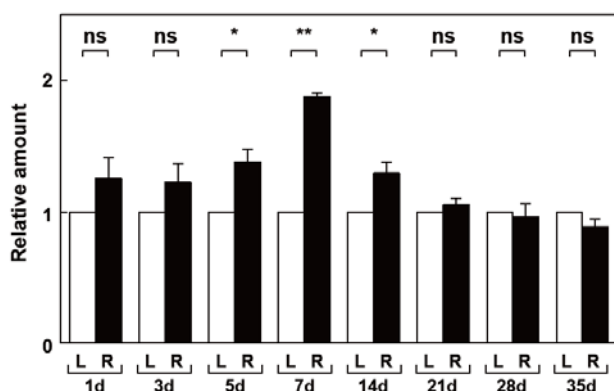


図 1 傷害顔面神経核におけるグリコーゲン量

神経切断後、1、3、5、7、14、21、28、35 日に両神経核を採取し、グリコーゲン定量を行った。傷害側のグリコーゲン (μg)/mg は、コントロール側のそれを 1.0 とした時の相対値で示した。

3-2 グリコーゲン抗体を使用した免疫組織化学

最初に、グリコーゲン抗体の特異性を肝臓の切片を使って調べた。グリコーゲン抗体を添加しないと染色性は全く見られなかったが、その抗体を添加した場合は、切片上の広範囲に多くのグリコーゲン粒子が検出された。しかし、切片を α -アミラーゼで前処理すると、この染色性は完全に消失した。従って、このグリコーゲン抗体の特異性には問題のないことが確認された。

次に、この免疫組織化学によって、脳幹の顔面神経核のグリコーゲンを染色した。神経切断後 1 日の脳幹では、傷害神経核とコントロール神経核のグリコーゲン染色性には違いが認められなかった。しかし、神経切断後 7 日の脳幹では、傷害側において染色されるグリコーゲン顆粒が増加することが明らかになった。また、21 日後になると、傷害核とコントロール核における差は観察されなくなった。

3-3 グリコーゲン合成細胞の同定

上記のように、神経傷害後 7 日で、顔面神経核にグリコーゲン量が増加したが、このグリコーゲンを合成する細胞種は不明であった。そこで、神経傷害後 7 日めの脳切片を用いて、蛍光二重染色により、グリコーゲンを合成・貯蔵する細胞の同定を行った。その結果、ほとんどのグリコーゲン顆粒は、運動ニューロンのマーカーである NR3B 染色細胞内に存在することが明らかになった（図 2）。

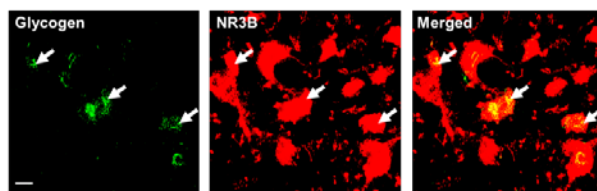


図 2 グリコーゲンと運動ニューロンの共染色

神経切断後 7 日めの脳幹切片を、抗グリコーゲン抗体（左）および抗 NR3B 抗体（中）を用いて蛍光二重染色を行った。それぞれ、Alexa Fluor 488（緑）と Alexa Fluor 568（赤）を用いて可視化した。それらを重ね合わせた図を右側に示した。矢印はグリコーゲンの局在を示している。スケールバー：20 μm 。

また、アストロサイトがグリコーゲンを貯蔵している可能性も検証した。その結果、グリコーゲンの染色と GFAP 陽性アストロサイトの共局在性は全く観察されなかった。このように、グリコーゲン抗体を使用した免疫組織化学から、傷害顔面神経核中のグリコーゲン合成細胞は、主に運動ニューロンであることが示された。

3-4 顔面神経核のグリコーゲン合成／分解酵素

グリコーゲンは、グリコーゲン合成酵素（EC 2.4.1.11; GS）によって合成され、グリコーゲンホスフォリラーゼ（EC 2.4.1.1; GP）によって分解される。従って、神経系のグリコーゲンの増減も、これらの酵素量の増減および活性化／不活性化によって調節されると考えられた。そこで、顔面神経切断後に、GS および GP の変動を経時的に測定した。

その結果、傷害神経核の GS は、傷害後 1～5 日までは特に変動しなかったが、7～14 日になると有意に低下した。この結果は免疫組織化学によっても認められた。しかし、28～35 日になると、ほとんどコントロール側のレベルに回復した。すなわち、GS は傷害後、一過性の減少を示すのである。一方、GP は、傷害後、1～35 日まで、ほとんど変化しないことが明らかになった。従って、この GS 量と GP 量の変動からグリコーゲンの変動を説明すると、傷害後 7～21 日ごろにグリコーゲンの低下が予想されるだけで、図 1 の結果を説明できるものではなかった。

グリコーゲン合成は、リン酸化された不活性型 GS (pGS) と脱リン酸化された活性型 GS の割合で調節されるので、次に、総 GS 量とは別に pGS 量を測定した。その結果、pGS は、傷害後 1～3 日に有意に減少することが明らかになった。総 GS に対する pGS の比 (pGS/GS) を取ると、傷害側では、1～3 日に、コントロール側に比べてかなり低下することが明らかになった (図 3)。また、7～14 日になると、その比は、有意に増加することも示された (図 3)。しかし、21～35 日経過すると、pGS/GS 比はほとんど変化しないことがわかった。すなわち、傷害神経核では、1～3 日にかけてグリコーゲン合成が活発になり、7 日過ぎには、グリコーゲン合成が抑制されると推測された。

生体中のグリコーゲン量は、GP 活性によっても影響をうけるので、活性なリン酸化 GP (pGP) の変動も知る必要があるが、現在、この抗体は市販されていないため、本研究では測定することができなかった。ただ、顔面神経系と同類の座骨神経系では、運動ニューロンが傷害されると、14～56 日後に GP 活性が増加する (6) という結果が報告

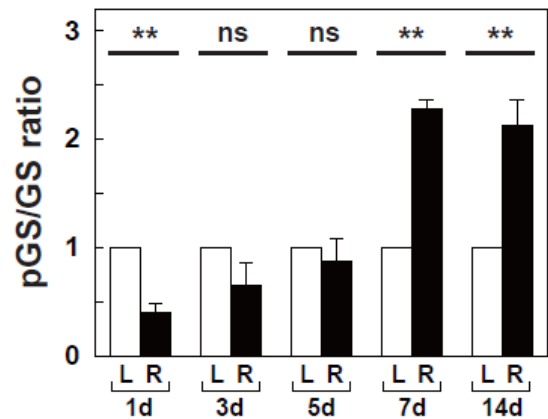


図 3 不活性グリコーゲン合成酵素の変動

顔面神経切断後、1、3、5、7、14 日に両神経核を採取し、イムノブロットにより、総 GS および pGS を分析した。pGS バンドおよび GS バンドの濃さを測定し、pGS/GS 比を求めた。コントロール側の値を 1 としたときの相対値で示した。

されているので、これを参考にすると、傷害顔面神経核においても、14 日以降、pGP が増加すると推測できる。従って、傷害顔面神経核で、14 日以降、グリコーゲン量が低下していくのは (図 1)、pGS 量の増加とともに pGP が増加するためと考えられた。

4. 結論

ラット顔面神経核の運動ニューロンは、傷害後一過性にグリコーゲンを増加させた。このグリコーゲンの増加は不活性型 GS の減少によって起こること、そして、その後に見られるグリコーゲンの減少は、不活性型 GS の増加と活性型 GP の増加によって起こることが明らかになった。

5. 参考文献

- (1) Ichimiya T., et al. 2013. Brain Res 1507:35-44.
- (2) Yamamoto S., et al. 2010. J Neurochem 115:1057-1067.
- (3) Graeber M.B., Kreutzberg G.W. 1988. J Neurocytol 17:209-220.
- (4) Ito D., et al. 1999. Neurosci Res 35:207-215
- (5) Smith C.B., et al. 1984. J Neurosci 4:2489-2496.
- (6) Woolf C.J., et al. 1984. Neurosci 12:1261-1269.
- (7) Borke R.C., Nau M.E. 1984. Dev Brain Res 318:277-284.
- (8) Jirmanová I. 1971. Acta Neuropath 19:110-120.